

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-501301

(P2001-501301A)

(43) 公表日 平成13年1月30日 (2001.1.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 27/26	3 2 5 E
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		C 1 2 M 1/00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-512676
(86) (22) 出願日 平成9年8月18日 (1997.8.18)
(85) 翻訳文提出日 平成11年3月4日 (1999.3.4)
(86) 国際出願番号 PCT/US 97/14489
(87) 国際公開番号 WO 98/10273
(87) 国際公開日 平成10年3月12日 (1998.3.12)
(31) 優先権主張番号 08/708, 262
(32) 優先日 平成8年9月6日 (1996.9.6)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, BR, CA, CN, JP, KR, NZ

(71) 出願人 ナノゲン・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、バシフィック・センター・コート10398番
(72) 発明者 ソスノースキー, ロナルド・ジョージ
アメリカ合衆国92118カリフォルニア州コロナド、アデラ・アベニュー1013番
(72) 発明者 パトラー, ウィリアム・フランク
アメリカ合衆国92009カリフォルニア州カールスバッド、カロマ・サークル7577番
(74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エレクトロニック・ハイブリダイゼーション反応の最適化のための方法および物質

(57) 【要約】

以下の発明は、超小型電子チップおよび装置において、DNA輸送速度、DNAハイブリダイゼーション反応効率および全ハイブリダイゼーション特異性を改良または最適化する種々のパラメーター、電解液（緩衝液）および他の条件に関係する発見に関する。詳細には、本発明は、低導電率の双性イオン緩衝溶液、とりわけ約50 mMの濃度並びにpI（等電点約pH 7.47）およびその付近で調製されたアミノ酸ヒスチジンを含有するそれらが、迅速な電気泳動DNA輸送および効率的なハイブリダイゼーション反応について共に、最適条件を提供するという発見に関する。次の最良の既知緩衝剤、システインに関して少なくとも10倍のハイブリダイゼーション効率を達成する。試験データは、システインに比較してハイブリダイゼーション効率において約50,000倍の増大を示す。

【特許請求の範囲】

1. (1) 低導電率緩衝液を装置に適用し、
(2) 装置に電流を適用して試験部位にて電場を生じさせ、
(3) 試験部位まで標的核酸を輸送し、次いで、
(4) 同一条件下のシステインについてより少なくとも10倍大きいハイブリダイゼーション効率で、試験部位にて捕獲核酸に対して標的核酸をハイブリダイズする工程を含むことを特徴とする捕獲核酸を担う、少なくとも1つの試験部位を有する超小型電子装置において、標的核酸を輸送しハイブリダイズさせる方法。
2. 低導電率緩衝液が双性イオン緩衝液である請求項1記載の方法。
3. 双性イオン緩衝液がヒスチジンを含む請求項2記載の方法。
4. ヒスチジンが約10-100mMの濃度で調製された請求項3記載の方法。
5. ヒスチジンが等電点またはおよそ等電点で調製された請求項3記載の方法。
6. 等電点が約pH 7.47である請求項1記載の方法。
7. 緩衝性存在物が、標的核酸および捕獲核酸間のハイブリダイゼーションを安定化する請求項1記載の方法。
8. 緩衝性存在物が低導電率を有する天然化合物である請求項7記載の方法。
9. 緩衝性存在物が天然の、双性イオン化合物である請求項7記載の方法。
10. 緩衝性存在物が低導電率を有する合成化合物である請求項7記載の方法。
11. 緩衝性存在物が合成の、双性イオン化合物である請求項7記載の方法。
12. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも100倍大きい請求項1記載の方法。
13. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも1,000倍大きい請求項1記載の方法。
14. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも約50,000倍大きい請求項1記載の方法。
15. 緩衝性存在物が、捕獲核酸および標的核酸間の斥力を低下させる請求項1記載の方法。

16. 緩衝液が、捕獲核酸および標的核酸間の付加物形成を低下させる請求項1記載の方法。

17. 低導電率緩衝液を装置に適用し、

装置にパワーを適用して、装置の微小位置試験部位にて、標的核酸の電気泳動輸送および蓄積を引き起こし、次いで

同一条件下のシステインについてより、少なくとも10倍大きい効率で、標的核酸をハイブリダイズさせる工程を含むことを特徴とする、捕獲核酸を有する微小位置試験部位を含む超小型電子ハイブリダイゼーションにおいて、標的核酸の電気泳動輸送およびハイブリダイゼーション効率を増強する方法。

18. 低導電率緩衝液が双性イオン緩衝液である請求項17記載の方法。

19. 双性イオン緩衝液がヒスチジンを含む請求項18記載の方法。

20. ヒスチジンが約10-100mMの濃度で調製された請求項19記載の方法。

21. ヒスチジンが等電点またはおよそ等電点で調製された請求項19記載の方法。

22. 等電点が約pH 7.47である請求項17記載の方法。

23. 緩衝性存在物が、標的核酸および捕獲核酸間のハイブリダイゼーションを安定化させる請求項17記載の方法。

24. 緩衝性存在物が低導電率を有する天然化合物である請求項23記載の方法。

25. 緩衝性存在物が天然の、双性イオン化合物である請求項23記載の方法。

26. 緩衝性存在物が低導電率を有する合成化合物である請求項23記載の方法。

27. 緩衝性存在物が合成の、双性イオン化合物である請求項23記載の方法。

28. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも100倍大きい請求項17記載の方法。

29. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも1,000倍大きい請求項17記載の方法。

30. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも約50,000倍大きい請求項17記載の方法。

31. 緩衝性存在物が、捕獲核酸および標的核酸間の斥力を低下させる請求項17記載の方法。

32. 緩衝液が、捕獲核酸および標的核酸の付加物形成を低下させる請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

エレクトロニック・ハイブリダイゼーション反応の

最適化のための方法および物質

発明の分野

本発明は、医学診断用途、生物学的用途および他の用途に適合する電子装置に用いる緩衝液および電解液に関する。より詳細には、超小型電子医学診断装置で行うDNAハイブリダイゼーション分析での有利な使用を目的とした緩衝液および電解液に関する。

発明の背景

近年、超小型電子技術および分子生物学を結合させた装置への関心が増大している。かかるシステムの1つは、1993年11月1日付で出願され、現在米国特許第5,605,662号として公開されたシリアル番号第08/146,504号の「ACTIVE PROGRAMMABLE ELECTRONIC DEVICE FOR MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS AND DIAGNOSTICS」に開示され、ここに出典明示して本明細書の一部とみなす。そこに開示されたシステムは、APEXシステムと言われる。APEXシステムは、核酸ハイブリダイゼーション、抗体/抗原反応、臨床診断および生体高分子合成のごとき分子生物学的反応において、有利に用いられ、広範な機能を果たすことができる。

APEX型装置は、それらの操作に緩衝液および電解液を利用する。緩衝液は、酸またはアルカリの添加に対してpH変化に抵抗性のある化学溶液として定義される。例えば、Dictionary of Biotechnology、2版、James Coombs、stockton Press参照。そこに記載されたごとく、「伝統的に、無機塩（リン酸塩、炭酸塩）および有機塩（酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、グリシン、マレイン酸塩、バルビツール酸塩等）に基づく緩衝液

を生物学実験において用いた。」

ハイブリダイゼーション、反応、診断および合成を行う分子生物学的電子装置

において有利に用いられる緩衝液および電解液を見出すことが本発明の目的である。

発明の概要

下記の発明は、本発明者らのA P E X超小型電子チップおよび装置におけるDNA輸送速度、DNAハイブリダイゼーション反応の効率および全ハイブリダイゼーション特異性を改良または最適化する種々のパラメーター、電解液（緩衝液）および他の条件に関連する発見に関する。詳細には、本発明は低導電率双性イオン緩衝溶液、とりわけ10-100mM、好ましくは約50mMの濃度またはpI（等電点約pH7.47）またはその付近にて調製されたアミノ酸ヒスチジンを含有するものが、迅速なDNA輸送および効率的なハイブリダイゼーション反応について最適化条件を提供するという発見に関する。次の最もよく知られた緩衝液、システインに対して少なくとも10倍のハイブリダイゼーション効率が達成される。試験データは、システインに比較してハイブリダイゼーション効率においておよそ50,000倍の増大を示す。

図表の簡単な記載

図1は、ヒスチジン緩衝液を利用したチェッカーボード配列の平面図である。

発明の詳細な記載

さまざまなタイプの電解液/緩衝溶液において、DNAの電気泳動輸送および他の荷電分析物に関係する種々の物理的パラメーターがある。ある種の装置、例えば、前記の米国特許第5,605,662号に記載のごとき出願人のA P E X装置は、基本的に装置表面に電場を生成するDC（直流）電気装置である。次いで、これらの場合は、装置表面に反対に（+/-）偏った微小位置（microlocation）間に荷電分子の電気泳動輸送を引き起こす。対照的に、いわゆるジノセンサー（Genosensor）（インピーダンス・センサー）（例えば、WO93/226

78のHolliesら、「Optical and Electrical Methods and Apparatus for Molecular Detection」参照）、および二次元電気泳動（dielectropho

resis) 装置 (例えば, Washizu 25 Journal of Electrostatics) 109-123、1990参照) は、AC電場での使用を含む。これらの装置に関する重要な相違点は、これらのAC場が印加される場合、これらのシステムのいずれにおいても本質的に正味の電流はない、すなわち、荷電分子輸送用の電気泳動の推進力はない点である。APEX型装置は、電圧が印加される場合、かなりの正味の直流電流(DC)を生じさせ、それは「電気泳動のサイン」として認識される。電気泳動において、イオンまたは荷電粒子の移動は、電場勾配の方向に沿った電気力によって生じ、電流および電圧の関係は、この技術に重要である。この電気泳動的移動は、印加された電圧の影響下、溶液中の電流伝導性としてそれ自体肉眼的に示され、

$$V = R \times I$$

Vは電位である

Rは電解液の電気抵抗である [$V \times A^{-1} = R (\Omega)$]

Iは電流である[A]。

のオームの法則に従う。

溶液の抵抗は、伝導率測定器によって測定できる導電率の逆数である。導電率は、主に緩衝液/電解液のイオン種およびそれらの濃度に依存し；従って、これらのパラメーターは電場関連分子生物学的技術に非常に重要である。生じた電場は本当に顕微鏡的環境におけるものであるが、基本的な電流/電圧関係は、いずれの他の電気泳動システムについてとも同様にAPEX技術につき本質的に同じである。

電流および電圧を供給する種々の方法および電流および電圧の筋書が、いかにしてかかるシステムの性能を改良するのに見出されたかに関して、APEXシステムはユニークな特徴がある。詳細には、いくつかのDCパルス手法(線形および対数勾配)が、改良されたハイブリダイゼーションストリンジェンシーを提供するらしい。

電気泳動輸送—対—イオン強度

荷電分析物種(蛋白質、DNA等)の移動度において対数的減少があり、電解

溶液のイオン強度の平方根に反比例することが、電気泳動の分野においてよく確立されている（「Capillary Electrophoresis: Principles and Practice」、R. KuhnおよびS. Hoffstetter、Springer-Verlag、1993の83頁および図3. 16参照）。いずれかの所与の一定の電場強度にて、電解液濃度は分析物種（蛋白質、DNA等）に対して減少するにつれ、分析物はより速い速度にて輸送されるであろう。ダンシルアミノ酸について、この効果を示す同様の結果が、J. J. Issaqら、Chromatographia Vol. 32、# 3/4、1991年8月、155ないし161頁（詳細には、157頁図3参照）によって示されている。DNAについてこの効果は異なる電解溶液であることを示す結果が、P. D. RossおよびR. L. Scruggs、Biopolymers Vol. 2、231ないし236頁、1964（詳細には、232頁図1参照）に示されている。

イオン強度/導電率の関係

溶液（ $\text{Na}^+ \longleftrightarrow \text{Cl}^-$ 、 $\text{K}^+ \longleftrightarrow \text{Cl}^-$ 等）中の完全解離したアニオンおよびカチオンを含む非緩衝性電解液（塩化ナトリウム、塩化カリウム等）について、イオン強度および導電率は等価である、すなわち導電率は通常イオン強度に比例する

であろう。それらの解離状態（例： $2\text{Na}^+ \longleftrightarrow \text{PO}_4^{3-}$ ）にある緩衝性電解質

（リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩等）について、イオン強度および導電率は、通常等価になるであろう、すなわち導電率はイオン強度に比例する。双性イオン種（それらのpIにて正味の荷電をしない）を有することができる緩衝性電解液〔グッド緩衝液（MOPS、HEPES、TAPS、トリシン、ピシン）、アミノ酸緩衝液、両性電解液等〕について、導電率は、等電点（pI）および（pKa）間の毎pH単位差につきおよそ10倍減少するであろう。例えば、その双性イオン状態（ $\text{OOC}-\text{CH}(\text{R})-\text{NH}_3^+$ ）にあるアミノ酸は、「アミノ酸部分」が

十分な正味の正電荷 ($\text{HOOC}-\text{CH}(\text{R})-\text{NH}_2^+ \longleftrightarrow \text{X}^-$) または十分な正味の負の電荷 ($\text{Y}^+ \longleftrightarrow ^-\text{OOC}-\text{CH}(\text{R})-\text{NH}_2$) を有する場合よりおよそ1000倍低い導電率値を有するであろう。従って、そのpIから離れるにつれ、形式的な負または正の電荷がアミノ酸部分で発生し、導電率およびイオン強度は関連しだすであろう。しかしながら、pIまたはその付近にて、導電率は所与のイオン強度または濃度で予期されるより大変低いであろう。それらのpIまたはその付近にて用いられる場合、電気泳動のテキストは、グッド緩衝液およびアミノ酸緩衝液が「高イオン強度または濃度にて低導電率」を有すると言及する (Capillary Electrophoresis: Principles and Practice)、R. KuhnおよびS. Hoffstetter、Springer-Verlag、1993の88頁参照)。通常用いられる電気泳動緩衝液「トリス-ホウ酸」は、實際上、そのイオン強度または濃度から予期されるよりかなり低い導電率を有する。これは、溶液中で比較的安定した双性イオン複合体を形成する「トリス・カチオン」および「ホウ酸アニオン」のためかも知れない。100mMトリス-ホウ酸溶液の導電率は $694 \mu\text{S}/\text{cm}$ であると測定され、これはそのイオン強度から予期されるよりおよそ20倍低く、5mMリン酸ナトリウムまたは塩化ナトリウム溶液とおよそ等価であった。表1は、多数の輸送緩衝液の導電率測定値を示す。

溶液/ 緩衝液	測定 1	測定 2	測定 3	平均/ 標準偏差
10 mM MgCl ₂	1.95 mS/cm	2.02 mS/cm	2.13 mS/cm	2.03+/-0.09 mS/cm
1 mM MgCl ₂	174 μ S/cm	208 μ S/cm	177 μ S/cm	186+/-18.8 μ S/cm
0.1 mM MgCl ₂	16.9 μ S/cm	16.7 μ S/cm	18.3 μ S/cm	17.3+/-0.87 μ S/cm
10 mM NaCl	1.07 mS/cm	1.10 mS/cm	1.18 mS/cm	1.12+/-0.057 mS/cm
1 mM NaCl	112 μ S/cm	115 μ S/cm	111 μ S/cm	112.7+/-2.08 μ S/cm
0.1 mM NaCl	8.80 μ S/cm	8.98 μ S/cm	10.5 μ S/cm	9.43+/-0.93 μ S/cm
20 mM NaPO ₄	2.90 mS/cm	2.79 mS/cm	3.00 mS/cm	2.90+/-0.11 mS/cm
10 mM NaPO ₄	1.40 mS/cm	1.44 mS/cm	1.48 mS/cm	1.44+/-0.04 mS/cm
1 mM NaPO ₄	122 μ S/cm	128 μ S/cm	136 μ S/cm	128.7+/-7.0 μ S/cm
50 mM TRIS	3.50 mS/cm	3.14 mS/cm	3.40 mS/cm	3.35+/-0.19 mS/cm
10 mM TRIS	572 μ S/cm	562 μ S/cm	583 μ S/cm	572+/-10.5 μ S/cm
250 mM HEPES	141 μ S/cm	144 μ S/cm	158 μ S/cm	147.6+/-9.07 μ S/cm
25 mM HEPES	9.16 μ S/cm	9.44 μ S/cm	10.5 μ S/cm	9.7+/-0.71 μ S/cm
3.3 mM クエン酸Na	964 μ S/cm	964 μ S/cm	1.03 mS/cm	986+/-18.1 μ S/cm
5 mM コハク酸Na	1.05 mS/cm	960 μ S/cm	1.01 mS/cm	1.01+/-0.045 mS/cm
5 mM シュウ酸Na	1.02 mS/cm	1.03 mS/cm	1.12 mS/cm	1.06+/-0.055 mS/cm
10 mM 酢酸Na	901 μ S/cm	917 μ S/cm	983 μ S/cm	934+/-43.5 μ S/cm
250 mM システイン	27.4 μ S/cm	17.3 μ S/cm	23.5 μ S/cm	22.7+/-5.09 μ S/cm
ミリー-Q 水	<0.5 μ S/cm			0.1セルの検出限界 より低い

表 1

双性イオン緩衝液/導電率/輸送速度

それらのpIまたはその付近にて、双性イオン緩衝液（グッド緩衝液、アミノ酸緩衝液）またはトリス-ホウ酸緩衝液を用いた場合、ある有利さがDNAの電気泳動輸送の割合および速度に関して存在する。これらは、1) かかる緩衝液は

、比較的高濃度にて用いることができ、緩衝能を増大させ、2) それらの導電率が同一濃度にて他のタイプの緩衝液よりかなり低く、また、3) 注目する分析物(DNA)について高い電気泳動輸送率の有利さを得ることである。

等電点(pI)での双性イオン緩衝能

アミノ酸緩衝液は、それらのpIにて緩衝特性を有する。所与のアミノ酸は、そのpIにてその「最高緩衝能」を有するかまたは有しないかもしれないので、それはいくらか緩衝能を有するであろう。緩衝能は、pIおよびpKaの間の毎pH単位差について10倍減少し、3種のイオン化可能基(ヒスチジン、システイン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸等)を有するアミノ酸は、一般的に2種の解離のみを有するアミノ酸よりそれらのpIにて高い緩衝能を有する。例えば、それらのpIにて比較的低い緩衝能を有するアラニンまたはグリシンに比較して、ヒスチジンpI=7.47、リジンpI=9.74およびグルタミン酸pI=3.22の全ては、それらのpIにて比較的良好な緩衝能を有する(A. L. Lehninger、Biochemistry、2版、Worth Publishers、New York、1975; 詳細には79頁の図4-8および80頁図4-9参照)。ヒスチジンは、ゲル電気泳動で使用される緩衝液として推奨されてきたが、ハイブリダイゼーションは、かかるシステムにおいては行われない。米国特許第4,936,963号参照。システインは、緩衝能に関してより中間的な位置にある。システインのpIは5.02、 α カルボキシル基のpKaは1.71、スルフヒドリルのpKaは8.33、また α アミノ基のpKaは10.78である。250mMシステインの酸/塩基滴定曲線は、システインが20mMリン酸ナトリウムより約pH5にて良好な「緩衝能」を有することを示す。pH4ないし6の範囲にて、システインの緩衝能は、とりわけ高いpHにて、20mMリン酸ナトリウムより有意に優れ

ている。しかしながら、これらのpH範囲において、250mMシステイン溶液の導電率は、100倍大きい約2.9mS/cmの値を有する20mMリン酸ナトリウムに比較して非常に低い約23 μ S/cmである。図1は、種々の輸送用緩衝液の導電率測定値を示す。

20年以上前に開発されたいくつかの電気泳動技術は、「それらのpIにて」双性イオン緩衝液中の蛋白質を分離する能力に基づいている。これらの技術は、等電点電気泳動法、イソタコフォレシス (Isotachopheresis) および等電点分画法と呼ばれる (B. D. Hames および D. Rickwood による「Gel Electrophoresis of proteins : A Practical Approach」の第3章および第4章、IRL Press 1981 参照)。これらの適用について、全てそれらのpIにて、いくつかのアミノ酸緩衝液およびグッド緩衝液が用いられた (前記引用文献の168頁表2 参照)。

低イオン強度および低導電率緩衝液におけるDNA輸送

2.5%アガロースをコートした5580チップおよびByTr-RC A 5 蛍光性プローブを用いて、一連の蛍光性チェッカーボード試験を行った。以下のシステム：(1) 250mM HEPES (低導電率)、(2) 10 μ M コハク酸ナトリウム、(3) 10 μ M クエン酸ナトリウムおよび(4) 蒸留水の全てに迅速な(6秒)チェッカーボード・アドレッシングを達成できた。クエン酸ナトリウムの結果を図1に示す。一方、いくつかのタイプの低導電率または低イオン強度溶液は、幾分良好な特質であるチェッカーボード・アドレッシングを有し、迅速なDNA輸送(80 μ mパッドの6ないし12秒のDNA蓄積)がこれらの全てのシステムを用いて達成された。さらに、DNA (それ自体がポリアニオン) は、導電率を提供するバルク溶液中に存在する電解質であるので、蒸留水中のDNAアドレッシングAPEXチップが可能である。図1は、ヒスチジンを用いたAPEXチップの平面図を示す。

電気泳動輸送速度およびカチオン/アニオン種の関係

荷電分析物種 (DNA、蛋白質等) の移動度が電解溶液のイオン強度に関係するという事実に加えて、また、その移動度は、電解溶液中のカチオンおよびアニオン種の性質によって大きく影響される (「Capillary Electrophoresis : Principles and Practice」参照)。前記Biopolymer、Vol. 2、pp. 231-236、1964

文献に、DNA輸送についてこの特殊な点が示されている。この文献の232頁の図1は、同一のイオン強度にて、異なる1価アニオン ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{TMA}^-$) を有する電解液を用いる場合のDNA移動度の変化を示す。基本的には、異なるカチオンは、DNAリン酸基で異なる会合定数を有し、および/またはDNA分子周囲の水和領域を変化させ、これは輸送速度の変化に導くことができる。

本発明は、電場分子生物学的装置、とりわけAPEX微小電子チップおよび装置において、DNA輸送速度、DNAハイブリダイゼーション反応効率および全ハイブリダイゼーション特異性を改良または至適化する種々のパラメーター、電解液（緩衝液）および他の条件に関連する本発明者らの発見に関する。詳細には、本発明は、pI（等電点約7.47）またはその付近で10–100mM、とりわけ約50mMの濃度にて調製されたアミノ酸ヒスチジンを含有する低導電率の双性イオン緩衝溶液が、迅速な電気泳動DNA輸送および効率的なハイブリダイゼーション反応について共に至適条件を提供するという本発明者の発見に関する。ヒスチジン緩衝液のこの有利さは、特にAPEXチップ型装置に重要である。

これらの特別な装置（マイクロ機械加工型装置とは対照的に）は、印加できる電流および電圧の量に関して限界を有する。この限界は、同一緩衝液システムを用いて迅速な輸送および効率の良いハイブリダイゼーションを共に達成するのを困難にする。これらの場合、限られた電流/電圧が迅速な輸送を依然として引き起こす低導電率緩衝液（システインまたはアラニン）中で、DNA輸送を行った。これらの条件下、DNAは試験部位で蓄積したが、効率的にハイブリダイズしなかった。これらの低導電率緩衝液中の輸送の後、溶液を高い塩緩衝液（>100mM 塩化ナトリウムまたはリン酸ナトリウム）に変更し、これは次いで試験部位で効率的なハイブリダイゼーションを引き起こした。

表2は、緩衝能、pHおよび導電率のパラメーターと、APEXチップ装置を用いたDNA蓄積およびハイブリダイゼーション感度（効率）とを関連付ける一連試験についての結果を示す。

溶液	緩衝能 pH 4-10	p I での p H	導電率 (μS)	相対DNA 輸送速度	SA- ビオチン T12 感度	DNAの ハイブリダイ ゼーション 感度
β -アラニン	$pK_1 - 3.6$ $pK_2 - 10.2$	+	7.3	10.0	(+++++) (最高速)	3×10^4
タウリン	$pK_1 - 1.5$ $pK_2 - 8.7$	+/-	4.6	4.5	++++	$> 7.5 \times 10^{10}$
システイン	$pK_1 - 1.7$ $pK_2 - 8.3$ $pK_3 - 10.8$	+/-	5.2	25.0	++++	3×10^7 7.5×10^{10}
ヒスチジン	$pK_1 - 1.8$ $pK_2 - 6.0$ $pK_3 - 9.0$	+++	7.6	212.0 (172.0 高純度)	+++	3×10^4 3×10^4
リジン	$pK_1 - 2.2$ $pK_2 - 8.9$ $pK_3 - 10.3$	++	9.6	477.0	++	$> 7.5 \times 10^{10}$
$NaPO_4$	複合体	+	7.4 ^{1/}	1,400.0	(最低速)	

表 2

詳細には、表2は、試験部位で特異的捕獲DNAへの輸送された標的DNAのハイブリダイゼーションに対する種々の双性イオンアミノ酸緩衝液[β -アラニン、タウリン、システイン、ヒスチジン、リジンおよびリン酸ナトリウム(双性イオン緩衝液ではない)]の効果を示す。輸送に関して、一般的に導電率は同一場条件下で輸送と相関する。 β -アラニン、タウリンおよびシステインは、優れた輸送を示し、ヒスチジンは良好な輸送を示し、また、リジンおよび $NaPO_4$ はかなりの輸送を示す。DNAハイブリダイゼーション感度は、負に荷電したポリアニオン性リン酸骨格を有する「標準的DNA」について報告されている。

1/ pH 7.4に合わせた20mM $NaPO_4$

また、ハイブリダイゼーション感度に加えて、表2はストレプトアビジン/ビオチンDNAプローブ捕獲親和性に関する感度を示す。

表2は、DNA輸送(蓄積)と低導電率(β -アラニン、タウリン、システイン、ヒスチジン)との相関関係を明確に示す。表は、 β -アラニン、システインおよびヒスチジンを用いるストレプトアビジン/ビオチンプローブの親和性反応について優れた感度を示す。表2の感度データに反映されたごとく、ヒスチジン

は、システインまたは20mM NaPO₄のごとき他の緩衝液のいずれかより良好なハイブリダイゼーション効率を4オーダー以上大きく提供する。システインに対する改善は、少なくとも10倍で、より詳細には10²倍であり、最も詳細には、少なくとも10⁴倍である。最も重要なことには、表2は、DNAハイブリダイゼーション感度(効率)がヒスチジン緩衝液について非常に良好であることを示すことである。従って、現在試験された双性イオンアミノ酸緩衝液のうち、ヒスチジンが良好な輸送および良好なDNA/DNAハイブリダイゼーション効率を共に提供する唯一のものである。

ヒスチジン緩衝液系の低導電率は、迅速な輸送(蓄積)の原因であると信じられている。なぜヒスチジン緩衝液が、比較的有効なDNA/DNAハイブリダイゼーションを引き起こすのかに関していくつかの可能な説明がある。一つの長所が、ヒスチジンの優れた緩衝能であるのかもしれない。7.47のそのpIにて、ヒスチジンは、酸性または塩基性条件下で優れた緩衝液である(A. L. Lehninger、Biochemistry、2版、worth Publishers、New York、1975、80頁図4-9参照)。DNAがハイブリダイゼーションのために蓄積され、ヒスチジンがこれらの条件を効率的に緩衝するかもしれない正電極にて、APEXチップは酸を生成する。より重要なことは、これらの酸性条件(pH<5)下、ヒスチジンのイミダゾール基のプロトン化が分子のジカチオン種への転化を開始する。正に荷電した α -アミノ基および正に荷電したイミダゾール基を有するこのジカチオン種は、ハイブリダイゼーションを促進し、APEXチップの正電極にて形成されたDNA/DNAハイブリッドを安定化させるのを助けるかも知れないのが当てはまる場合であろう。カチオン、ジカチオンおよびポリカチ

オンは、二本鎖DNA構造上の負に荷電したリン酸骨格の斥力を低下させることによって、DNA/DNAハイブリッドの安定化を助けることが知られている。また、DNA/DNA/ヒスチジンは、正電極にて生成する他の電気化学的生成物(過酸化水素等)からのいくつかのタイプの安定化付加物を形成するかも知れないという可能性がある。

本具体例は、天然に生じたヒスチジンを利用するが、本発明は良好な緩衝能、低導電率（または双性イオン特性）を有し、電荷安定化または付加物形成によって、DNAハイブリダイゼーションを安定化させる特性を有する他の天然または合成化合物に十分に適用できる。

前記発明は、明確化および理解を目的とする図示および例の方法によって、いくらか詳細に記載したが、ある種の変更および修飾が、添付された請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなしに成され得ることは、本発明の教授の知識において当業者には容易に明らかであろう。

【図1】

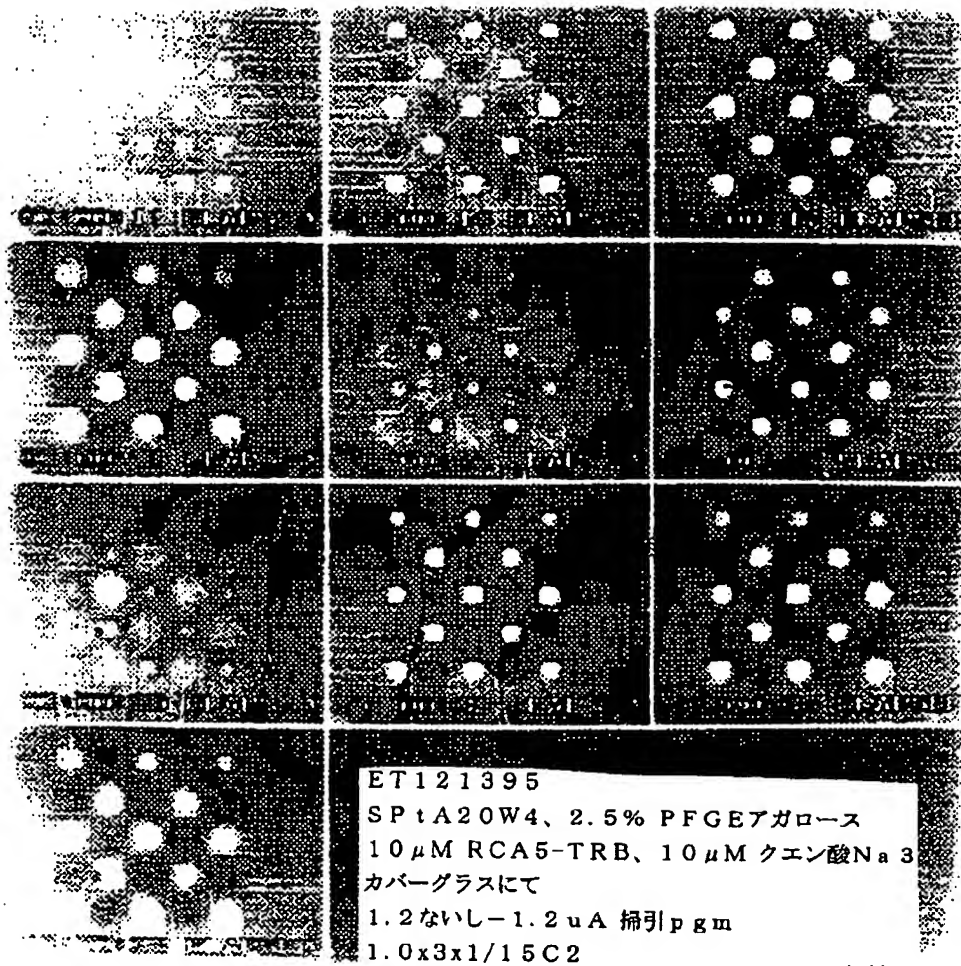
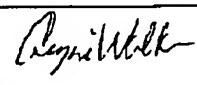


FIG. 1.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/14489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(5) : Please See Extra Sheet. US CL : 204/430, 468; 433/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 204/430,468;433/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, USPAT, JPOABS, WPIBS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4,936,963 A (MANDECKI ET AL) 26 June 1990 (26/06/90) see entire document.	1-11
—		—
Y		1-11
Y	US 5,436,129 A (STAPLETON) 25 July 1995 (25/07/95) see entire document.	1-11
E	US 5,593,838 A (ZANZUCCHI ET AL) 14 January 1997 (19/01/97) see entire document.	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 SEPTEMBER 1997		Date of mailing of the international search report 05 DEC 1997
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JOHN S. STARSIAK JR.  Telephone No. (703) 308-0661

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/14489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (6):

G01N 27/26, 27/447; C12N 15/00

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード(参考)
// C 1 2 M 1/00		C 1 2 N 15/00	A
(72)発明者	トゥー, ユージーン アメリカ合衆国92103カリフォルニア州サンディエゴ、ラーク・ストリート3527番		
(72)発明者	ネレンバーグ, マイケル・アービング アメリカ合衆国92126カリフォルニア州サンディエゴ、カミニト・イノセンタ11256番		
(72)発明者	ヘラー, マイケル・ジェイムズ アメリカ合衆国92024カリフォルニア州エンシニタス、ホーク・ビュー・ドライブ1614番		

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成17年4月7日(2005.4.7)

【公表番号】特表2001-501301(P2001-501301A)

【公表日】平成13年1月30日(2001.1.30)

【出願番号】特願平10-512676

【国際特許分類第7版】

G 0 1 N 27/447

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/566

// C 1 2 M 1/00

【 F I 】

G 0 1 N 27/26 3 2 5 E

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 M 1/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成16年7月8日(2004.7.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手続補正書

平成16年 7月 8日



特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成10年特許願第512676号

2. 補正をする者

氏名(名称) ナノゲン・インコーポレイテッド

3. 代理人

住所

〒540-0001

大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル

青山特許事務所

電話 06-6949-1261 FAX 06-6949-0361

氏名

弁理士 (6214) 青山 葆



4. 補正により増加する請求項の数 12

5. 補正対象書類名 請求の範囲

6. 補正対象項目名 請求の範囲

7. 補正の内容
別紙のとおり。

(別紙)

請 求 の 範 囲

1. 超小型電子装置上の正に偏った試験部位での電場における試験部位にて結合した一本鎖捕獲DNAに対するDNA分析物のハイブリダイゼーションを電氣的に増強する方法であって、

(1) 該装置に緩衝液を適用し、ここに該緩衝液は、以下の基準：

(a) 低導電率を有する緩衝液、

(b) 3.5を超える天然の等電点 (pI) を有する緩衝液、および

(c) 実質的に pH 4 と pH 10 との間の有効な緩衝能力を有する緩衝液により選択され、

(2) (a) 超小型電子装置上の試験部位にて電場を生じさせ、ここに、該試験部位は、DNA分析物に対して正に偏り、次いで

(b) 電場の影響下で緩衝分子に正味の正電荷を供し、ここに、正に荷電した緩衝分子は、DNA分析物と試験部位にて結合した一本鎖捕獲DNAとの間のDNAハイブリダイゼーションを安定化させるように機能する
のに十分な量で超小型電子装置上の試験部位に電流を印加する
工程を含むことを特徴とする該方法。

2. 低導電率緩衝液が双性イオン緩衝液である請求項1記載の方法。

3. 双性イオン緩衝液がヒスチジンを含む請求項2記載の方法。

4. ヒスチジンが約10-100mMの濃度で調製された請求項3記載の方法。

5. ヒスチジンが等電点またはおよそ等電点で調製された請求項3記載の方法。

6. 等電点が約pH 7.47である請求項1記載の方法。

7. 緩衝性存在物が、標的核酸および捕獲核酸間のハイブリダイゼーションを安定化する請求項1記載の方法。

8. 緩衝性存在物が低導電率を有する天然化合物である請求項7記載の方法。

9. 緩衝性存在物が天然の、双性イオン化合物である請求項7記載の方法。

10. 緩衝性存在物が低導電率を有する合成化合物である請求項7記載の方法。

11. 緩衝性存在物が合成の、双性イオン化合物である請求項7記載の方法。

12. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも100倍大きい請求項1記載の方法。

13. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも1,000倍大きい請求項1記載の方法。

14. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも約50,000倍大きい請求項1記載の方法。

15. 緩衝性存在物が、捕獲核酸および標的核酸間の斥力を低下させる請求項1記載の方法。

16. 緩衝液が、捕獲核酸および標的核酸間の付加物形成を低下させる請求項1記載の方法。

17. 捕獲核酸を有する微小位置試験部位を含み、ここに、該微小位置が、該微小

位置にて電場が生成されない第1の状態、および標的核酸に誘引性の電場が生成される第2の状態に少なくとも置かれるように印加する超小型電子ハイブリダイゼーション装置における標的核酸のハイブリダイゼーション効率を増強する方法であって、

緩衝液を該装置に適用し、

該装置に標的核酸を供し、

該装置へのパワーの適用を介して微小位置を該第2の状態に置いて、装置上の微小位置試験部位にて標的核酸の蓄積を引き起こし、次いで

該第1の状態においてより、該第2の状態において大きな効率で標的核酸と捕獲核酸とをハイブリダイズさせる工程を含むことを特徴とする該方法。

18. 緩衝液が低導電率緩衝液である請求項17記載の方法。

19. 低導電率緩衝液が双性イオン緩衝液である請求項18記載の方法。

20. 双性イオン緩衝液がヒスチジンを含む請求項19記載の方法。

21. ヒスチジンが約10－100mMの濃度で調製された請求項20記載の方法。

22. ヒスチジンが等電点またはおよそ等電点で調製された請求項20記載の方法。

23. 等電点が約pH 7.47である請求項18記載の方法。

24. 緩衝性存在物が、該第2の状態において標的核酸および捕獲核酸間のハイブリダイゼーションを安定化させる請求項18記載の方法。

25. 緩衝性存在物が低導電率を有する天然化合物である請求項24記載の方法。

26. 緩衝性存在物が天然の、双性イオン化合物である請求項24記載の方法。

27. 緩衝性存在物が低導電率を有する合成化合物である請求項24記載の方法。

28. 緩衝性存在物が合成の、双性イオン化合物である請求項24記載の方法。

29. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも100倍大きい請求項18記載の方法。

30. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも1,000倍大きい請求項17記載の方法。

31. ハイブリダイゼーション効率が、同一条件下のシステインについてより、少なくとも約50,000倍大きい請求項17記載の方法。

32. 緩衝性存在物が、該第2の状態において捕獲核酸および標的核酸間の斥力を低下させる請求項17記載の方法。

33. 緩衝液が、捕獲核酸および標的核酸間の付加物形成を低下させる請求項17記載の方法。

34. 低導電率が、実質的に1 mS未満である請求項1記載の方法。

35. 低導電率が、実質的に500 μ s未満である請求項1記載の方法。

36. 低導電率が、実質的に250 μ s未満である請求項1記載の方法。

37. 低導電率が、実質的に100 μ s未満である請求項1記載の方法。

3 8. 緩衝液が、実質的に 7. 4 を超える天然の p I を有する請求項 1 記載の方法。

3 9. 緩衝分子が、試験部位の周囲の溶液を緩衝することにより正に偏った試験部位にて生成された水素からの分析物に対する保護を供する請求項 1 記載の方法。

4 0. 正味の正の荷電を有する緩衝分子がカチオンである請求項 1 記載の方法。

4 1. 正味の正の荷電を有する緩衝分子がジカチオンである請求項 1 記載の方法。

4 2. 正味の正の荷電を有する緩衝分子がポリカチオンである請求項 1 記載の方法。

4 3. DNA のシールドを実質的に不可能とし、かくして電場の不存在下にて DNA ハイブリダイゼーションを支持しないように、緩衝液が選択された請求項 1 記載の方法。

4 4. 緩衝液が、捕獲核酸および標的核酸間の付加物形成を低下させる請求項 1 7 記載の方法。